



**Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales**

**Estudio de la degradación del  
formaldehído de muestras biológicas.  
Propuesta de un método para su  
reutilización.**

---

**Victoria Zoeller**

Trabajo de Fin de Grado

Grado en Ciencias Ambientales

Febrero 2017

El presente Trabajo de Fin de Grado titulado: “*Estudio de la degradación del formaldehído de muestras biológicas. Propuesta de un método para su reutilización.*”, realizado por **Victoria Christine Zoeller**, fue realizado bajo la tutoría de Dr. **José Antonio Perales Vargas-Machuca**, profesor del departamento de Tecnologías del Medio Ambiente de la Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales de la Universidad de Cádiz y Dr. **Juan Ignacio González Gordillo**, profesor del departamento de Biología de la Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales de la Universidad de Cádiz.

Fdo Dr. **José Antonio Perales**  
**Vargas-Machuca**

Fdo: Dr. **Juan Ignacio González Gordillo**

En Puerto Real, Febrero de 2017

## Tabla de contenido

1. INTRODUCCIÓN .....	2
2. METODOLOGÍA .....	6
Determinación de la concentración de formaldehído.....	7
A) Espectrofotometría UV/VIS .....	8
B) Kit de titración HANNA Hi 3838 .....	9
C) Titración propuesta por Steedman, 1976.....	10
Reutilización del formaldehído .....	10
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	12
Determinación de la concentración de formaldehído.....	12
A) Espectrofotometría UV/VIS .....	12
B) Kit de titración HANNA Hi 3838 .....	16
C) Titración propuesta por Steedman, 1976.....	17
Influencia de diferentes factores en la degradación del formaldehído .....	18
A) Relación volumen de aire o biomasa/volumen de formaldehído. ....	18
B) Relación tiempo y taxón preservado con la concentración de formaldehído. ....	20
Propuesta de reutilización del formaldehído.....	23
A) Reducción de la turbidez. ....	24
B) Corrección del pH .....	25
C) Enriquecimiento del formaldehído hasta el 4%.....	25
D) Árbol de toma de decisiones .....	26
4. CONCLUSIONES .....	27
5. BIBLIOGRAFÍA.....	28

## **RESUMEN**

El presente trabajo pretende cuantificar cómo evoluciona la concentración de formaldehído de una solución conservante de muestras biológicas con el fin de: i) reducir los efectos e impactos del uso de éste, manteniendo una concentración mínima de formaldehído en las muestras que garantice una buena conservación de éstas; ii) encontrar una manera fácil de reutilizar el formaldehído ya usado, para su uso en nuevas muestras. Para ello se estudió el efecto en la degradación del formaldehído del tiempo de conservación, la relación volumen de biomasa conservada/volumen de formaldehído, proporción aire/formaldehído y el taxón conservado. Para la determinación de la concentración de formaldehído, se probaron tres métodos: espectrofotometría UV/vis, titración basada en un kit comercial y titración tradicional. El método espectrofotométrico no fue considerado válido debido a su poca sensibilidad. No se detectó una relación en la degradación del formaldehído y la proporción biomasa/formaldehído, aire/formaldehído o taxón, pero sí una relación negativa con el tiempo. Además se propone una metodología sencilla y de bajo impacto para reutilizar el formaldehído desechado, consiguiendo una solución tamponada de baja turbidez y formaldehído al 4%.

## **ABSTRACT**

This study tries to quantify how the concentration of formaldehyde from preserved biological samples evolve, in order to: i) reduce the impacts of its use, using the minimum amount of formaldehyde which guarantees the preservation of samples; ii) find an easy method to reuse this chemical for new samples. For this reason, the effect on the degradation of formaldehyde of the preservation time, the ratio biomass/formaldehyde, ratio air/formaldehyde and the different taxas preserved were studied. For the determination of the concentration of formaldehyde, three different methods were tested: UV/vis spectrophotometry, titration using a commercial kit, and a traditional procedure. Spectrophotometry was proved to be not valid because of its low sensibility. The ratio of preserved biomass/formaldehyde, air/formaldehyde and the different taxas showed no influence on the degradation of formaldehyde, but time did show a negative tendency. Furthermore, an easy low impact method to reuse formaldehyde solutions, obtaining a new, low turbidity and buffered 4% solution of formaldehyde, has been proposed.

## 1. INTRODUCCIÓN

El formaldehído ( $\text{CH}_2\text{O}$ ), también conocido como formol, es uno de los reactivos más comunes para la conservación de muestras biológicas ya que es económico, de fácil acceso y adecuado para la mayoría de las muestras biológicas en un gran rango de concentraciones. Una gran cualidad de este conservante es que no endurece las muestras por exceso de fijación conservando así el aspecto inicial de estas (Steedman, 1976). La fijación se produce por una reacción del formaldehído con aminas primarias tales como las aminas de lisina o las reacciones con tioles de cisteína así como con otros grupos menos reactivos (grupos amínicos de glutamina y asparagina) formando enlaces intra e inter-moleculares (Bach & Baker, 2012; Baker & McCrae, 1966; Steedman, 1976). Incluso es posible extraer el ADN de muestras antiguas, si estas han sido preparadas bajo condiciones específicas (Tokuda *et al.*, 1990).

El uso del formaldehído como conservante fue descubierto por el médico alemán F. Blum en el año 1893 (Blum, 1893). Blum buscaba un desinfectante eficaz y para ello analizó el efecto bactericida del formaldehído diluido al 4% sobre diferentes bacterias (usando una dilución al 10% del formaldehído comercial al 37 - 40% de pureza). Al observar que el formaldehído endurecía la piel de sus dedos al igual que el alcohol, el cual se utilizaba como conservante de las muestras en aquella época, analizó las muestras que previamente había tratado con formaldehído, para probar su efectividad como desinfectante, y llegó a la conclusión que esta sustancia podía ser un buen conservante (Fox *et al.*, 1985).

El formaldehído se comercializa en forma de solución incolora, de olor fuerte e irritable por ser muy volátil a temperatura ambiente, aunque también se puede encontrar en forma sólida, conocida como paraformaldehído. Este es muy soluble en agua dando lugar al formaldehído, pero es muy inestable y rápidamente precipita para volver a su forma de paraformaldehído. Para evitar la polimerización a paraformaldehído, el formaldehído es normalmente estabilizado con 15% de metanol, por lo que se suele comercializar en disolución al 37-40% de máxima pureza (Gullickson, 1994; Martínez *et al.*, 2000; Rodríguez *et al.*, 2006; Walker, 1944).

En la actualidad existen otros medios de conservación con grupos funcionales de aldehídos tales como Acetaldehído, Glutaraldehído y Acroleína, pero estos poseen

algunas desventajas como su toxicología, precio o menor poder de penetración (Seilnacht, 2016; Steedman, 1976).

Otros conservantes de muestras biológicas son los alcoholes como el etanol al 70 o 50% o el isopropanol, etilenglicol, propilenglicol, entre otros (The Smithsonian Institution, 2017). La desventaja en comparación con el formaldehído es que en muchos casos se observa una alteración cromática de los organismos y una contracción fuerte de los tejidos de estos, cambiando así su aspecto.

En cuanto a salud humana, el uso de formaldehído presenta algunos inconvenientes como irritación de ojos y piel y la aparición de alergias (Formafix, 2017; Gullickson, 1994). Es más, la International Agency For Research On Cancer (IARC, 2012) lo clasificó como sustancia cancerígena para humanos (Grupo 1). También es tóxico para organismos acuáticos, p.ej. la concentración letal para la mitad de la población ( $CL_{50}$ ) del salmón *Chanos chanos* es de 232 mg/l en 96 horas, subiendo su concentración letal media al disminuir el tiempo,  $CL_{50}(72) = 241$  mg/l,  $CL_{50}(48) = 260$  mg/l y  $CL_{50}(24) = 322$  mg/l. *Daphnia magna* tienen una  $CL_{50}(48h) = 2$  mg/l y para muchas algas una concentración mínima de 0,003 - 0,005% es letal (Bartolomé & Sánchez, 2007; Martínez *et al.*, 2000; Rodríguez *et al.*, 2006). Por ello, se ha de evitar que restos de formaldehído lleguen al medio ambiente. Los residuos de esta sustancia se han de recoger y llevar a un gestor autorizado. A todo esto hay que sumar otro coste ambiental derivado del consumo de carburantes para el transporte, energía para su destrucción y consumo de materias primas. Por lo tanto la posibilidad de reutilizar el formaldehído no solamente reduce el impacto medioambiental sino que también presenta una ventaja económica (ahorro de costes de destrucción y compra de formol nuevo).

En la actualidad existen compañías que reciclan el formaldehído, como la empresa Formafix (Formafix, 2017) que recicla el conservante altamente concentrado utilizado en hospitales. Pero no solamente la reutilización del formaldehído ya utilizado puede representar una ventaja, si no que la buena práctica del uso de esta sustancia también ayuda a minimizar su residuo.

El pH del formaldehído es ácido, variando entre 2.5 y 5, ya que se generan ácidos orgánicos a través de diferentes mecanismos que se mencionan más adelante. Para conservar las muestras adecuadamente, algunas requieren un pH neutro o alcalino,

por lo que se suele tamponar con tetraborato sódico, el cual aumenta el pH hasta 8 y mantiene la disolución estable.

Es conocido que la correcta conservación de muestras biológicas durante largo tiempo requiere una concentración mínima de formaldehído, la cual depende de la cantidad de muestra biológica. Según los protocolos de conservación de muestras se recomienda una concentración mínima del 4% (Steedman, 1976).

Sin embargo, muchas muestras se deterioran con el tiempo si no se renueva el formaldehído de manera periódica. Esto es debido a que éste incurre en diferentes reacciones químicas que reducen su concentración. Las reacciones más importantes son:

- La reacción del formaldehído con la biomasa, también llamada fijación (Fox *et al.*, 1985).
- La reacción de desproporción de formaldehído formando un ácido y un alcohol, conocida como reacción Cannizzaro (Vutturi, 2015).
- La oxidación, formando ácido fórmico (Technologies, 2017).
- La Polimerización (Fox & Whitesell, 2004).

La reacción del formaldehído con la biomasa es una reacción aconsejable, ya que en parte es responsable de que las muestras no se alteren con el tiempo, además de eliminar las bacterias que finalmente son las responsables de la descomposición de las mismas (Fox *et al.*, 1985). En cambio las otras tres reacciones pueden causar problemas en la conservación de las muestras, bien formando ácidos que a su vez pueden reaccionar con las muestras biológicas y destruirlas parcialmente (p.ej. esqueletos calcáreos), o bien formando compuestos insolubles como el paraformaldehído o sales insolubles del ácido que reaccionan con otros componentes del preparado. Así por ejemplo, algunos pigmentos de la sangre presentes en las muestras tienden a precipitar en presencia de un exceso de ácido fórmico (Bach & Baker, 2012). Los componentes insolubles causan turbidez y precipitados que en ocasiones se pueden confundir con restos de biomasa. Además, las muestras que contengan aceites o grasas se pueden volver amarillas con el tiempo, debido a que parte de la grasa o aceite se disuelve (Steedman, 1976). Por ello se recomienda cambiar el formaldehído de las muestras con relativa frecuencia. Pero cada cambio tiene un coste, las muestras pueden sufrir lesiones y se genera un residuo peligroso que tiene un alto coste ambiental.

Para reducir los efectos e impactos del uso del formaldehído, este trabajo tiene dos objetivos:

1. Estudiar la variación de la concentración de formaldehído en función del tiempo, proporción biomasa/formol, proporción aire/formol y en función del taxón conservado, para mantener una concentración mínima necesaria de formaldehído que garantice una buena conservación de muestras biológicas marinas.
2. Desarrollar una metodología sencilla para reutilizar el formaldehído usado y reducir los volúmenes de formaldehído desechado.



## 2. METODOLOGÍA

Se analizó la concentración de formaldehído y pH en 71 muestras biológicas marinas, con distintas características (proporción aire/formaldehído, proporción biomasa/formaldehído, diferentes taxones de organismos marinos y con diferentes periodos de almacenamiento, desde 1990 hasta 2016) con el objetivo de buscar un patrón que explique la degradación del formaldehído. Las proporciones de aire/formaldehído y biomasa/formaldehído se determinaron mediante medición volumétrica (Ecuación 1 y Ecuación 2).

$$\% AireFormaldehído = \left[ \frac{V_T - V_M}{V_M} \right] \cdot 100$$

Ecuación 1: Determinación volumétrica de la proporción Aire/Formaldehído

$$\% BiomasaFormaldehído = \left[ \frac{V_M - V_F}{V_M} \right] \cdot 100$$

Ecuación 2: Determinación volumétrica de la proporción Biomasa/Formaldehído

En donde:

%Aire/Formaldehído= proporción aire/formaldehído

%Biomasa/Formaldehído= proporción de aire/biomasa

$V_T$  = Volumen total del frasco (ml)

$V_M$  = Volumen de muestra (ml)

$V_F$  = Volumen de formaldehído (ml)

Los diferentes taxones que contenían las muestras se clasificaron por tamaños en grupos de: microplancton, mesoplancton, macroplancton (organismos gelatinosos), macrobentos (moluscos y decápodos), necton (peces) y muestras que contenían una mezcla de varios grupos (mix).

Los datos mayoritariamente fueron tratados con Excel, elaborando gráficos de dispersión para obtener la degradación en función del tiempo, del %biomasa/formaldehído y del %aire/formaldehído. Para contrastar si había diferencias significativas en la degradación de formaldehído debido a los diferentes taxones y al paso de los años, se usó el programa Primer 6 con el paquete Permanova (Permutational MANOVA), ya que los datos no seguían una normalidad ni eran homogéneos. En el

caso de haber diferencias significativas se aplicó la prueba pareada para saber entre que pares existía esa diferencia significativa.

### **Determinación de la concentración de formaldehído**

Para el desarrollo del trabajo fue esencial conocer inicialmente la concentración del formaldehído de las muestras. Por eso una de las primeras tareas fue encontrar un método de determinación de la concentración de formaldehído. Este método debía de ser rápido, fiable y de poco coste.

En base a estas características se intentó determinar la concentración mediante:

- Espectrofotometría de absorción ultravioleta visible (UV/vis) de acuerdo con el método espectrofotométrico propuesto por el Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo de España, por haberse ya utilizado este método en estudios anteriores (Bricker & Johnson, 1945; Jaman, *et al.*, 2015; Pascual & Freixa, 2004; Yoshikawa, *et al.*, 2011).
- Mediante volumetría, empleando un kit de análisis de formaldehído (HANNA, Ref Hi3838), y en otro caso siguiendo el procedimiento de titración propuesto por Steedman (1976).

Para las tres variantes se prepararon patrones de formaldehído (Ecuación 3) tanto en agua destilada como en agua de mar, obtenida de la Bahía de Cádiz y filtrada por 0,45  $\mu\text{m}$  (GE Healthcare Life Science Whatman, Ref. CAT No. 1825-047), con diferentes concentraciones de formaldehído (0.5, 1, 2, 4, 8%). Además se diferenció entre los patrones de formaldehído tamponado con tetraborato sódico y sin tamponar (Tabla 1).

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

En dónde:

$C_1$  = Concentración inicial de formaldehído (%)

$V_1$  = Volumen de formaldehído (ml)

$C_2$  = Concentración del formaldehído diluido (%)

$V_2$  = Volumen de agua necesario para diluir al formaldehído (ml)

Ecuación 3: Ecuación de dilución para la preparación de los patrones de formaldehído

Se evaluó si el método analítico seleccionado permitía diferenciar bien entre las diferentes concentraciones así como analizar la variabilidad de los resultados.

Tabla 1: Patrones con diferentes concentraciones de formaldehído tamponado como sin tamponar que se prepararon para la determinación de las rectas de calibrado.

<b>Formaldehído Tamponado</b>					
	0,5%	1,0%	2%	4%	8%
<b>Agua de Mar</b>	FTAM05	FTAM1	FTAM2	FTAM4	FTAM8
<b>Agua Destilada</b>	FTAD05	FTAD1	FTAD2	FTAD4	FTAD8
<b>Formaldehído sin tamponar</b>					
	0,5%	1%	2%	4%	8%
<b>Agua de Mar</b>	FSAM05	FSAM1	FSAM2	FSAM4	FSAM8
<b>Agua Destilada</b>	FSAD05	FSAD1	FSAD2	FSAD4	FSAD8

#### A) Espectrofotometría UV/VIS

A la hora de poner a punto el método espectrofotométrico la experimentación se centró en determinar:

- Qué solución emplear como blanco
- Qué longitud de onda presenta la máxima sensibilidad de análisis.

Para elegir el blanco se realizó una recta de calibrado para cada blanco (agua destilada, agua de mar y aire) y para cada longitud de onda entre 190 y 1100 nm. Una vez establecido el mejor blanco, se repitieron las rectas de calibrado un par de veces más, al objeto de comprobar la repetitividad (coeficiente de variación entre réplicas, Ecuación 4) y fijar una longitud de onda de medida (la que mayor coeficiente de variación y sensibilidad presentaba).

Una vez establecida la longitud de onda se realizaron nuevos barridos a esa longitud de onda de muestras con concentraciones conocidas, para así crear una recta de ajuste y su correspondiente ecuación que relaciona la absorbancia con la concentración.

$$CV = \frac{SD}{\bar{R}^2} \times 100$$

En dónde:

CV = Coeficiente de variación

SD = Desviación estándar

$\bar{R}^2$  = Media de los tres  $R^2$

Ecuación 4: Cálculo del coeficiente de variación

### B) Kit de titración HANNA Hi 3838

El kit de determinación de concentración de formaldehido es un kit compacto (Fig. 1), de uso fácil y rápido. Se basa en una titración ácido base con un indicador colorimétrico de pH. Así 0.5 ml de muestra de formaldehido se diluyeron en un medio básico (NaOH), el cual se valoró con un ácido desconocido hasta generar un cambio en el pH, el cual se observó por el viraje de color, de naranja a amarillo.



Fig. 1: Kit de titración HANNA Hi 3838

Se midieron las concentraciones de los patrones preparados con concentraciones conocidas (Tabla 1), para crear una recta que relacione la concentración medida con la concentración de los patrones, para comprobar si el método es adecuado y si tiene suficiente sensibilidad.

La concentración de formaldehido será el valor que indique la jeringuilla multiplicado por diez, aunque el principio recae en la (Ecuación 4).

### C) Titración propuesta por Steedman, 1976

Para esta titración fue necesario requerir de una balanza analítica, una bureta, erlenmeyer, timolftaleína al 0.1% en etanol, ácido sulfúrico 1N, solución saturada de sulfito sódico y una solución de hidróxido de sódico 1N. Se siguieron las instrucciones propuestas por Steedman (1976). Igual que en el caso anterior se trata de una titración ácido base con un indicador colorimétrico de pH. Esta vez se toman 3 gr. de muestra de formaldehído y se diluyeron en un medio básico (NaOH), el cual se valoró con ácido sulfúrico hasta generar un cambio en el pH, el color viró de azul a transparente debido a que el indicador fue la timolftaleína.

Al igual que con el kit de HANNA, se midieron las concentraciones de los patrones preparados con concentraciones conocidas (Tabla 1), para crear una recta que relacione la concentración medida con la concentración de los patrones, para comprobar la sensibilidad del método y si es adecuado. La concentración del formaldehído se calculó con la (Ecuación 5).

$$\% \text{Formaldehído} = \frac{V \times N \times 3,003}{P}$$

En dónde:

V = Volumen de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) consumido (ml)

N = Normalidad del H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

P = Peso de la muestra (g.)

Ecuación 5: Ecuación de determinación de la concentración del formaldehído mediante titración.

### Reutilización del formaldehído

El formaldehído usado para experimentar su posible reutilización, fue el formaldehído desechado del laboratorio de oceanografía del INMAR (Universidad de Cádiz), recogido en garrafas para llevarlo a residuos. Para reducir su turbidez se filtró utilizando una bomba de vacío y papel de filtro (73gr/m<sup>2</sup>). Un segundo filtrado en profundidad se realizó seguidamente utilizando 3 hojas sobrepuestas del mismo papel de filtro. Los valores de turbidez se midieron con espectrofotometría con un espectrofotómetro (GENESYS 10S UV-VIS) a 400 nm, para saber cuánto se reducía la turbidez para cada filtro. La medición de la turbidez se basa en la dispersión de un haz de luz a través de un medio que su luz resultante se ve disminuida por las partículas en

el medio, dependiendo de las partículas en el medio la señal final será de distinta intensidad que dará la señal (Acebo & García, 2013; APHA *et al.*, 1999; Martínez, 2006). Se midió el pH del residuo con tiras indicadoras universales (Scharlau, Ref. TP0014000S) y su concentración de formaldehído mediante titración (en este caso con el kit de HANNA). En aquellos casos en los que el pH resultaba ácido se agregaba tetraborato en exceso al residuo para volver a estabilizar su pH entre 7 y 8, dejando disolver este durante una semana con agitaciones diarias manuales. Después se filtró nuevamente con el mismo equipo para eliminar el tetraborato en exceso. Para calcular el volumen necesario de formaldehído concentrado a adicionar al residuo para enriquecer la solución hasta un 4% y así poder ser reutilizada se utilizó la siguiente ecuación (Ecuación 6):

$$V_I \times C_I + V_{Formol} \times C_{Formol} = V_F \times C_F$$

$$V_F = V_I + V_{Formol}$$

En dónde:

$V_I$  = Volumen inicial (ml)

$C_I$  = Concentración inicial (%)

$V_{Formol}$  = Volumen formaldehído (ml)

$C_{Formol}$  = Concentración formaldehído (%)

$V_F$  = Volumen Final (ml)

$C_F$  = Concentración final (%)

Ecuación 6: Ecuación de dilución, para la determinación del volumen de formaldehído necesario.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### Determinación de la concentración de formaldehído

El primer método que se utilizó fue la espectrofotometría UV/vis, debido a su disponibilidad en el laboratorio y porque se trata de un método rápido y sencillo (Bricker & Johnson, 1945; Jaman *et al.*, 2015; Pascual & Freixa, 2004).

#### A) Espectrofotometría UV/VIS

En la espectrofotometría es fundamental determinar cuál será el blanco, para establecer una línea base que permita obtener la mayor señal posible (Bricker & Johnson, 1945). De los tres blancos que se probaron (aire, agua destilada y agua de mar) se seleccionó el aire como blanco. La señal máxima de un patrón de formaldehído diluido en agua de mar hasta un 4%, utilizando el agua destilada y el agua de mar como blanco mostraron un valor de 0,036 unidades de absorbancia a  $\lambda = 1100$  nm y 0,04 unidades de absorbancia a  $\lambda = 1097$  nm respectivamente, mientras que con aire la señal máxima fue de 3,2 unidades de absorbancia a  $\lambda = 214$  nm. Por lo tanto se seleccionó el aire como blanco por su mayor sensibilidad.

El espectro de las soluciones de formaldehído tamponado y de formaldehído sin tamponar, mostraron formas similares (Fig. 2). Los intervalos de absorbancia dónde el coeficiente de variación presentó valores más bajos y mayor  $R^2$  fueron entre los 265 y 306 nm y entre los 940 y 995 nm (Fig. 2). Sin embargo los valores de la pendiente en este último intervalo fueron negativos, mientras que para el primero fueron positivos, por lo que se optó a seguir con el primer intervalo de absorbancias. Al ampliar éste se detectó una ligera diferencia entre la señal de máxima absorbancia del formaldehído tamponado y el del formaldehído sin tamponar (Fig. 3). El formaldehído  $\text{H}-\text{C}=\text{O}-\text{H}$  se encuentra en el grupo de los carbonilos, más explícitamente en el grupo de los aldehídos, de los cuales uno de sus rangos de absorbancia UV de la banda de electrones  $\pi\pi^*$  está entre 260 nm y 300 nm (Brauers *et al.*, 2007; Ríos, 2012). Esta banda de absorbancia coincide con el máximo de absorbancia que describen ambas curvas (Fig. 3). Ríos (2012) además describe que la longitud de onda a la que el formaldehído tiene mayor sensibilidad ( $\lambda_{\text{max}}$ ) en una solución de isopentano se encuentra a 305 nm y la  $\lambda_{\text{max}}$  del ácido fórmico a 205 nm, por lo que los espectros UV permiten distinguir entre los aldehídos y los ácidos como sus derivados. Esto resulta ser un factor importante para las

muestras, ya que en la conservación de las muestras es ideal tener la máxima concentración de formaldehído y no de ácido fórmico, porque este último ataca a las muestras de zooplancton degradándolas, sobre todo a las calcáreas. En este caso  $\lambda_{\text{max}}$  se encuentra un poco desplazada frente a los valores indicados por Ríos (2012), eso puede deberse a diversos factores como por ejemplo el pH, la concentración de sal o el disolvente en el que se encuentra el compuesto a determinar, ya que estos pueden alterar la carga de las moléculas, provocando un desplazamiento de los espectros UV (Díaz *et al.*, 2000). Debido a esta variación se optó por realizar las rectas de calibrado como fijar una longitud de onda de medida en base a los valores obtenidos con los patrones de formaldehído tamponado.

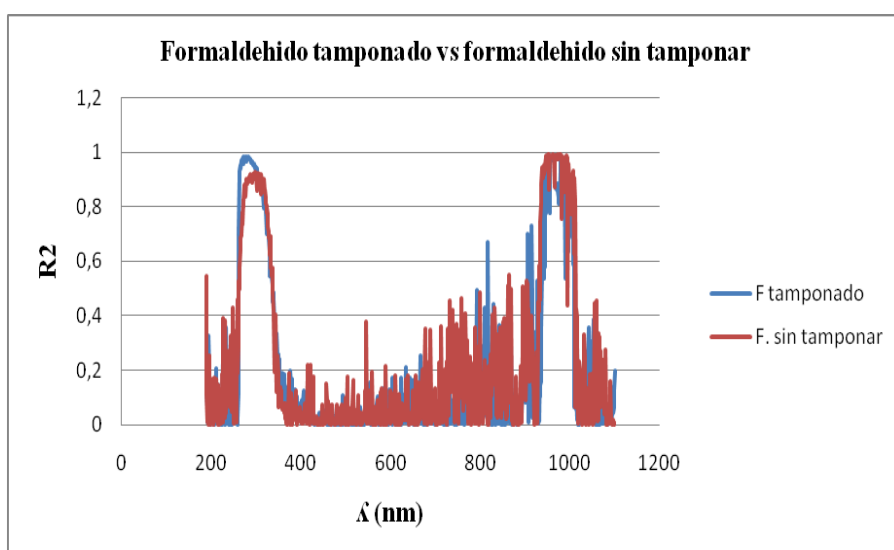


Fig. 2: Espectro de absorción del formaldehído tamponado y sin tamponar.

Para cada longitud de onda comprendida entre 190 nm y 1100 nm y utilizando 5 patrones de concentraciones (0.5, 1, 2, 4, 8%) de formaldehído tamponado se realizaron un total de 910 rectas de calibrado, para cada una de las tres réplicas. Los valores de  $R^2$  y pendiente de las rectas de calibrado por triplicado presentaron valores similares entre réplicas, lo cual nos da una idea de la repetitividad del método. El valor medio de la pendiente de las tres réplicas para cada longitud de onda se ha recogido en la Tabla 2.



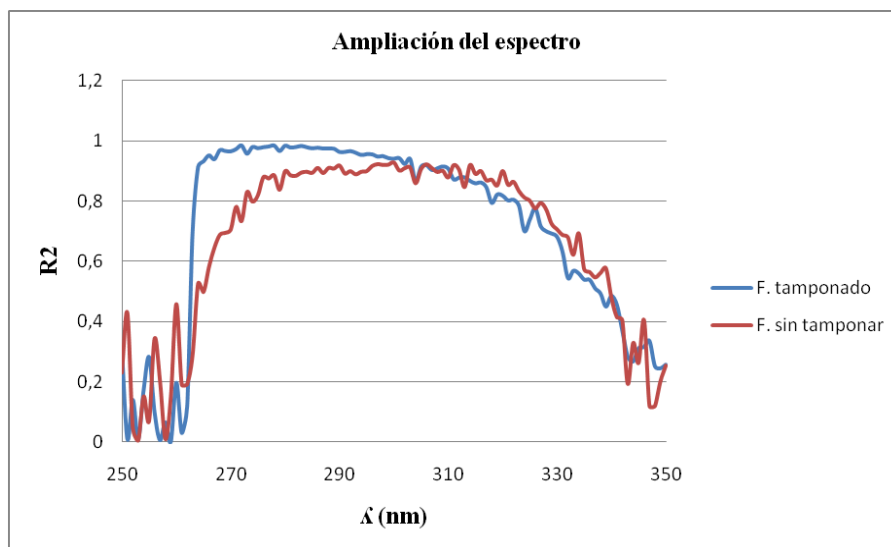


Fig. 3: Ampliación del espectro de absorción de formaldehído tamponado y sin tamponar en el intervalo entre 250 y 350 nm.

Una vez seleccionado el aire como blanco, el formaldehído tamponado como compuesto a determinar y el intervalo de longitudes de onda entre 250 y 350 nm, para seleccionar cual va a ser la longitud de onda que vamos a emplear y así determinar analíticamente la concentración de formaldehído, se escogió aquella que tuviera un mejor ajuste ( $R^2$  más cercano a 1) y que presentara menor variabilidad entre réplicas (coeficiente de variación (CV) bajo). Para lo cual en la figura 4 se ha representado el cociente entre el valor de  $R^2$  y el CV de las rectas de calibrado obtenidas para cada una de las longitudes de onda del intervalo estudiado. Se observó que este cociente fue máximo a 279 nm (Fig. 4). Debido a ello se decidió basar la ecuación que relaciona la absorbancia con la concentración de formaldehído a esa longitud de onda ( $\lambda = 279$  nm).

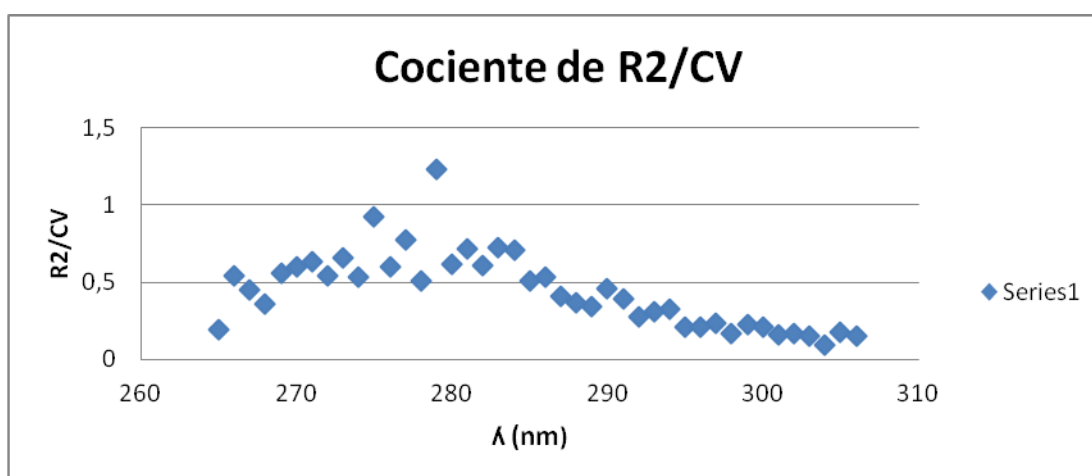


Fig. 4: Relación de  $R^2$  con el coeficiente de variación (CV) a distintas longitudes de onda ( $\lambda$ ) entre 260 y 310 nm.

Para que un método sea fiable tiene que ser repetitivo (similitud entre réplicas), tiene que ajustarse bien la recta (un valor de  $R^2$  alto) y tiene que presentar una sensibilidad alta (valor de la pendiente más cercano a 1 posible). Los primeros dos requisitos se cumplieron, pero al analizar la pendiente a 279 nm (Tabla 2), se observó que su valor fue bajo (0.005 unidades de absorbancia/%), lo cual indicó que se trataba de un método poco sensible. Por ello se optó por buscar otra longitud de onda con una mayor pendiente, para aumentar la sensibilidad del método, pero ninguna superó el valor de 0,006 unidades de absorbancia/% (Tabla 2). Por lo que finalmente el método de la espectrofotometría UV/vis se consideró no adecuado para determinar de forma fiable concentraciones de formaldehído comprendidas entre 0,5% y 8%, debido a su poca sensibilidad. En otros estudio (Bricker & Johnson, 1945; Díaz *et al.*, 2000; Jaman *et al.*, 2015; Martínez, 2006) se utilizó este método para la determinación de la concentración de formaldehído, pero en ellos el formaldehído se encontraba en otra forma o su concentración fue distinta.

Tabla 2:  $R^2$  y pendiente para cada longitud de onda entre 190 y 1100 nm.

$\lambda$ (nm)	$R^2$	m	$\lambda$ (nm)	$R^2$	m
265	0,947	0,003	286	0,974	0,004
266	0,942	0,004	287	0,970	0,004
267	0,973	0,005	288	0,968	0,003
268	0,968	0,005	289	0,965	0,003
269	0,973	0,005	290	0,968	0,003
270	0,983	0,006	291	0,957	0,003
271	0,978	0,006	292	0,951	0,003
272	0,974	0,006	293	0,955	0,003
273	0,978	0,006	294	0,952	0,003
274	0,977	0,005	295	0,943	0,003
275	0,983	0,005	296	0,938	0,002
276	0,979	0,005	297	0,934	0,002
277	0,981	0,005	298	0,922	0,002
278	0,976	0,005	299	0,939	0,002
<b>279</b>	<b>0,986</b>	<b>0,005</b>	300	0,929	0,002
280	0,979	0,005	301	0,924	0,002
281	0,978	0,005	302	0,924	0,002
282	0,979	0,005	303	0,915	0,002
283	0,980	0,004	304	0,884	0,002
284	0,979	0,004	305	0,925	0,002
285	0,974	0,004	306	0,917	0,002

Por último queda mencionar que también se observó una diferencia significativa, cuando se empleaba como patrón de concentración 0 agua de mar o agua destilada. Debido a ello se optó por seguir los experimentos solo con agua de mar, ya que todas las muestras por analizar estaban diluidas en agua de mar.

### B) Kit de titración HANNA Hi 3838

El kit de determinación de concentración de formaldehído es un kit compacto (Fig. 1), de uso fácil y rápido. Se basa en una titración muy simple con un cambio de color fácilmente distinguible de rojo a amarillo. La titración se lleva a cabo con una jeringuilla, la cual indica la concentración del formaldehído multiplicando el volumen consumido por 10. Como se puede observar en la figura 5, la representación de la concentración de formaldehído de los patrones frente a la concentración de formaldehído medida tanto para el formaldehído tamponado como sin tamponar tuvo una pendiente y un  $R^2$  muy próximos a la unidad, por lo que podemos considerar esta técnica como adecuada para la determinación de formaldehído para concentraciones entre 0,5-8%. La única desventaja de este método es su coste, ya que el precio de cada análisis es de 0,7 Euros.

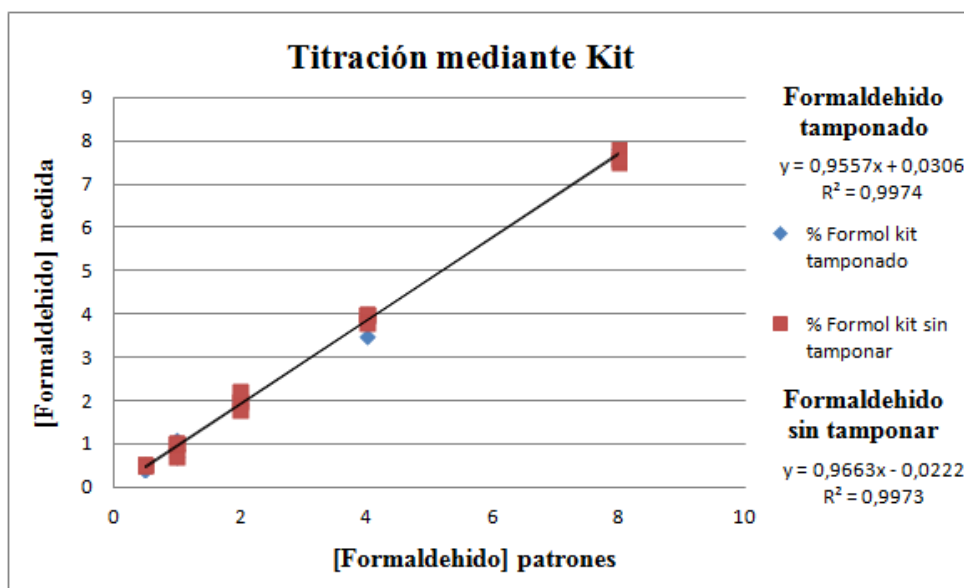


Fig. 5: Representación de la concentración de formaldehído sin tamponar (rojo) como la concentración del formaldehído tamponado (azul) medida por el kit de HANNA frente a la concentración de los patrones analizados.

### C) Titulación propuesta por Steedman, 1976

Al igual que la titulación mediante kit esta titulación también es un posible método para determinar la concentración de formaldehído. El método es preciso y sencillo, aunque requiere de una mayor infraestructura de laboratorio, presentando valores de  $R^2$  y pendiente similares al kit de HANNA, tanto para el formaldehído tamponado como sin tamponar (Fig. 5). Estos ensayos fueron algo más laboriosos, ya que se requiere de material de laboratorio específico como una balanza analítica, bureta etc. Además cada día que se mide la concentración de formaldehído de una o varias muestras hay que preparar una nueva disolución de sulfito sódico (Steedman, 1976).

Evaluando los dos métodos, ambos tienen similar precisión, sensibilidad (Fig. 5) y son fáciles de realizar, su diferencia se basa en el tiempo de análisis, el cual es mayor en la titulación tradicional así como el material requerido. Para investigadores que tienen a su disposición un laboratorio con el material necesario las dos versiones de titulación son adecuadas, sin embargo la titulación propuesta por Steedman (1976) es más económica. En el caso de que no haya disponibilidad de un laboratorio equipado con lo necesario; se necesite determinar la concentración de formaldehído de pocas muestras durante varios días y/o para ahorrar tiempo se recomienda utilizar el kit de HANNA.

Finalmente se optó por utilizar el kit de HANNA, para la realización de la segunda parte del estudio, ya que en esta hubo que medir la concentración de formaldehído de 71 muestras, en diferentes días.

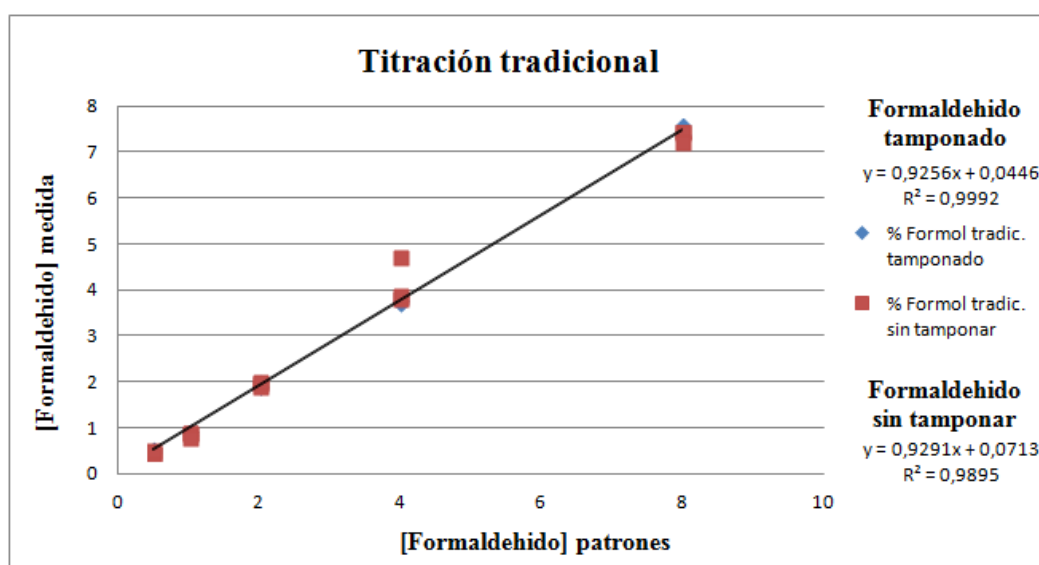


Fig. 6: Representación de la concentración de formaldehído sin tamponar (rojo) como la concentración del formaldehído tamponado (azul) medida por la titulación propuesta por Steedman (1976) frente a la concentración de los patrones analizados.

## **Influencia de diferentes factores en la degradación del formaldehído**

### **A) Relación volumen de aire o biomasa/volumen de formaldehído.**

En las figuras 7 y 8 se han representado el comportamiento del formaldehído en función de la proporción de aire/formaldehído y biomasa/formaldehído respectivamente. Como se puede observar no se aprecia una clara relación entre la relación de volúmenes biomasa/formaldehído o aire/formaldehído y la concentración de formaldehído encontrada (Fig. 7 y Fig. 8), lo que nos lleva a concluir que estos dos factores no afectan a la degradación del formaldehído, o al menos no con una significancia que hayamos podido detectar. En el caso del aire las oxidaciones son espontáneas pero de cinética lenta, asique solamente las oxidaciones avanzadas y no espontáneas reducirían la concentración de formaldehído significativamente (Guimarães *et al.*, 2012).

En lo referente a la biomasa en cambio los resultados no tienen fácil justificación, ya que está descrito que la biomasa si reacciona con el formaldehído (Fox *et al.*, 1985; Steedman, 1976). Puede que esta reacción no sea de importancia en los casos analizados, ya que las muestras estudiadas mayoritariamente se encontraban conservadas de acuerdo a las recomendaciones (Steedman, 1976), por ejemplo ninguna tenía más volumen de biomasa que de formaldehído. Otra causa puede ser debida a que el metanol, que se encuentra en la disolución de formaldehído como estabilizante, se oxidara formando formaldehído (Martínez *et al.*, 2000), lo cual causaría un aumento de formaldehído no considerada anteriormente. Además las muestras no variaban solamente en su biomasa sino también en otros factores a la misma vez, como por ejemplo en la concentración de aire, diversos taxones y en el tiempo. Está descrito que el formaldehído actúa diferente con diferentes tejidos (Steedman, 1976; Tokuda *et al.*, 1990). También está descrito que el formaldehído solamente conserva las muestras durante algunos años (Steedman, 1976), debido a ello se representó la concentración de formaldehído en función de la proporción biomasa/formaldehído y de la proporción aire/formaldehído para un año (2015) (Fig. 9 y Fig. 10). El resultado fue el mismo, la concentración de formaldehído se mantenía constante al variar la proporción aire/formaldehído y biomasa/formaldehído (Fig. 9 y Fig. 10). También podría ser que la biomasa afectase a la concentración de formaldehído solamente durante las primeras 24 horas (tiempo de fijación) (Fox *et al.*, 1985). Al cabo de un año, que es cuando se inició este estudio, ese efecto se podría ver enmascarado por otros factores.

Si se quisiera saber con certeza si estos factores (proporción volumétrica de aire/formaldehído y biomasa/formaldehído) afectan a la concentración de formaldehído se deberían preparar muestras *ad hoc* manteniendo el resto de factores constantes y solamente variar la proporción de aire/formaldehído o biomasa/formaldehído.

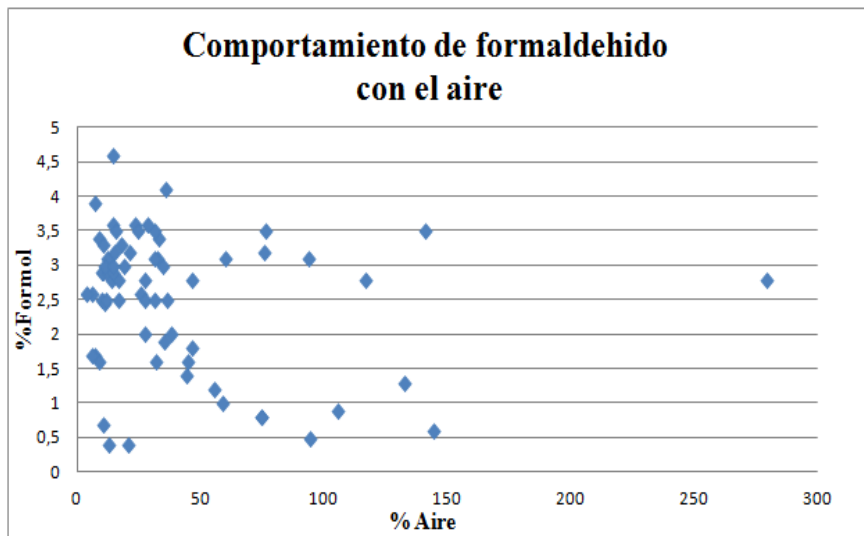


Fig. 7: Concentración de formaldehído en muestras biológicas conservadas con diferentes proporciones volumétricas Aire/solución.

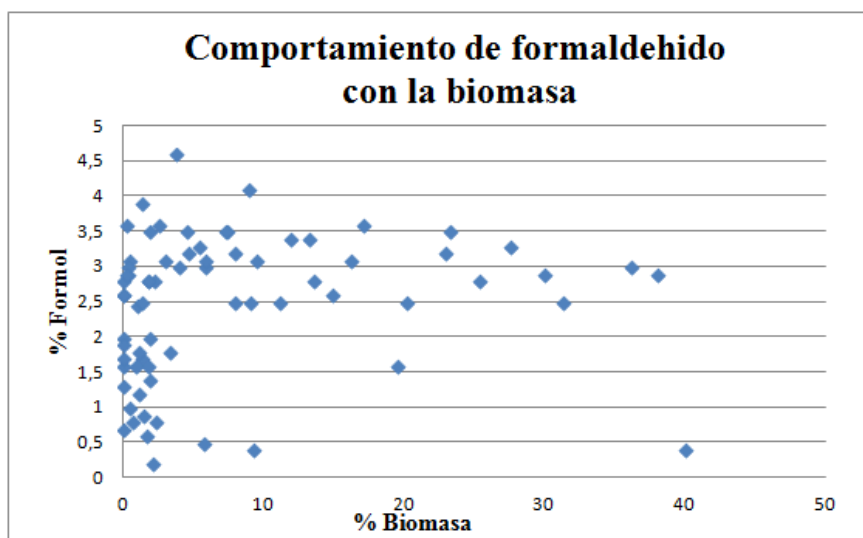


Fig. 8: Concentración de formaldehído en muestras biológicas conservadas con diferentes proporciones volumétricas Biomasa/solución.

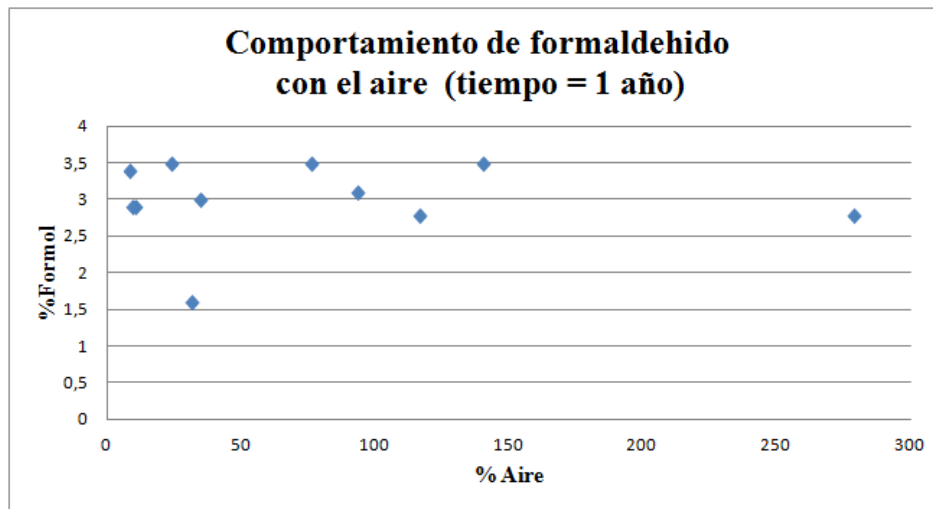


Fig. 9: Concentración de formaldehído en muestras biológicas conservadas con diferentes proporciones volumétricas Aire/solución con tiempo constante ( $t=1$  año).

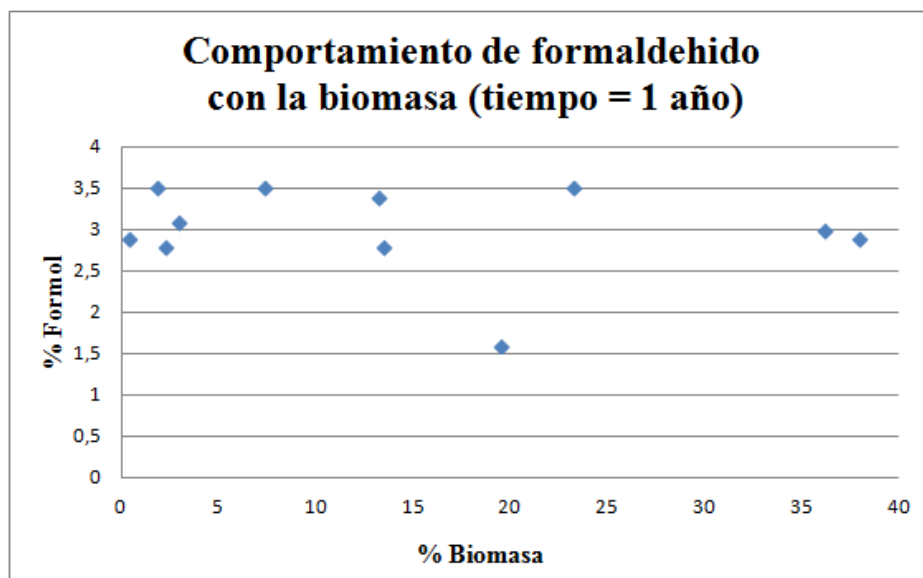


Fig. 10: Concentración de formaldehído en muestras biológicas conservadas con diferentes proporciones volumétricas Biomasa/solución con tiempo constante ( $t=1$  año).

## B) Relación tiempo y taxón preservado con la concentración de formaldehído.

La figura 11 muestra las concentraciones de formaldehído en muestras biológicas conservadas en distintas fechas. Como se puede observar, se aprecia una tendencia negativa. Tal como está documentado, la concentración de formaldehído disminuye con el tiempo (Steedman, 1976). También el análisis de PERMANOVA indicó una diferencia significativa con el tiempo (Tabla 3). Por lo tanto se puede afirmar que el formaldehído se degrada con el tiempo.

Al hacer la prueba pareada se vio que después de 17 años se empezaba a notar una diferencia significativa en la concentración de formaldehído (Tabla 4). Por lo que se puede indicar que no hay que cambiar el formaldehído cada pocos años (<17) ya que se suele mantener estable. Steedman (1976) describe que según las condiciones en las que se encuentra la muestra, la concentración se puede mantener estable durante varios años.

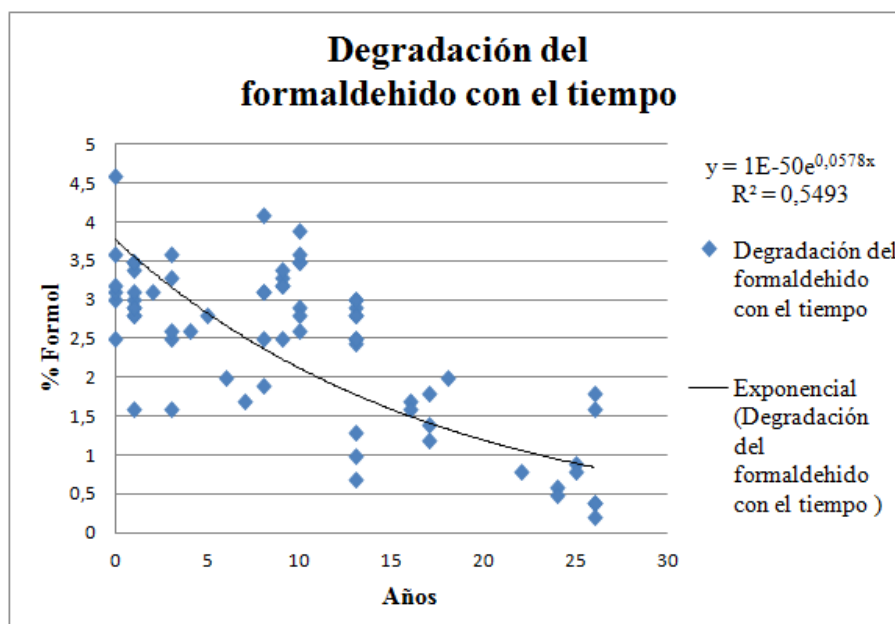


Fig. 11: Evolución de la concentración de muestras biológicas con el tiempo.

Para asegurarse de que las muestras a conservar se encuentran en buen estado sin cambiar el formaldehído, se puede medir su concentración. Para ello solamente se necesitan 0,5 ml de formaldehído de la muestra. En el caso de que haya bajado su concentración a un nivel crítico, se puede volver a restablecer su concentración añadiendo el volumen correspondiente de formaldehído concentrado (Ecuación 6).

En cambio, si consideramos el tipo de organismo conservado el análisis PERMANOVA salió no significativo (Tabla 3), por lo que se concluye que la degradación del formaldehído no depende de los distintos taxones estudiados. Aunque es recomendado conservar las muestras de distinta manera según algunos taxones (Steedman, 1976), eso no significa que el formaldehído se vea degradado de distinta manera dependiendo de los taxones, solamente indica que las muestras estarían mejor conservadas bajo distintas condiciones para evitar su propio deterioro.

Aunque según los experimentos realizados se ha podido concluir que hay algo que hace que se degrade el formaldehído a lo largo del tiempo, no se ha podido establecer el factor que produce esta degradación. No podemos excluir que los factores



estudiados (%aire/formaldehído, %biomasa/formaldehído y taxón) no influyan en la degradación del formaldehído ya que en cada caso no se estudiaron independientemente los tres factores. Para asegurarse de ello, se debería de estudiar cada factor independientemente manteniendo las otras condiciones constantes. Otros factores que también se deberían de estudiar es la salinidad y si el formaldehído se encuentra tamponado o no, ya que en la espectrofotometría se detectó una diferencia entre éstos (Fig. 3).

La temperatura también puede que influya, cuando ésta es baja ( $\leq 5^{\circ}\text{C}$ ) la formación de paraformaldehído se ve favorecida, mientras que a temperaturas altas se ve favorecida la formación de ácidos (Steedman, 1976).

Para garantizar además una buena conservación de muestras con concentraciones de formaldehído concretas, se recomienda seguir una de las propuestas de Steedman (1976), en la que al fijar las muestras diluidas (p.ej. plancton), se vierte primero la cantidad de formaldehído concentrado requerida al recipiente en el que se va a conservar la muestra y posteriormente se le añade la muestra y el agua hasta enrasar el frasco, ya que así se asegura la concentración requerida sin que ésta se vea diluida por el agua adicional que aporta la muestra en sí.

Además se recomienda usar formaldehído tamponado, ya que así se estabiliza la disolución a pH básico, evitando la formación más rápida de sus derivados, tanto de ácidos como de paraformaldehído (Steedman, 1976; Tokuda *et al.*, 1990).

Tabla 3: PERMANOVA con contraste de hipótesis. n= número de taxones o años, Perms = permutaciones, P (perm.) y P(MC) p-valores que indican el contraste de hipótesis  $< 0.05$  diferencia significativa. P(MC) es el p-valor de Monte Carlos que es más restrictivo.

<b>Categoría</b>	<b>n</b>	<b>P (perm.)</b>	<b>Perms.</b>	<b>P(MC)</b>
Taxón	6	0,1105	9916	0,1179
Paso de los años	18	0,0001	9925	0,0001

Tabla 4: Test de muestras pareadas que compara cada año con otro año. P (perm.) y P(MC) son p-valores que indican el contraste de hipótesis  $< 0.05$  diferencia significativa. P(MC) es el p-valor de Monte Carlos que es más restrictivo.

Grupo		P (perm.)	P(MC)	Grupo		P (perm.)	P(MC)
0	1	0,3395	0,2976	1	2	0,9209	0,8683
0	2	0,8616	0,7743	1	3	0,4354	0,4182
0	3	0,2341	0,2094	1	4	0,4899	0,4964
0	4	0,4232	0,3881	1	5	0,6702	0,7348
0	5	0,4285	0,5129	1	6	0,1645	0,1123
0	6	0,2834	0,1432	1	7	0,1651	0,043
0	7	0,2847	0,0918	1	8	0,8707	0,8594
0	8	0,4292	0,4208	1	9	0,718	0,6595
0	9	0,6297	0,5577	1	10	0,3673	0,3199
0	10	0,8636	0,8203	1	13	0,0287	0,0286
0	13	0,0204	0,0224	1	16	0,0396	0,006
0	16	0,0373	0,0196	1	17	0,0056	0,0008
0	17	0,0126	0,0044	1	18	0,1672	0,1109
0	18	0,2769	0,1474	1	22	0,0828	0,0036
0	22	0,1409	0,0209	1	24	0,0124	0,0001
0	24	0,035	0,0029	1	25	0,0127	0,0004
0	25	0,0373	0,0027	1	26	0,0011	0,0001
0	26	0,0025	0,0005				

### Propuesta de reutilización del formaldehído

En los laboratorios de biología es frecuente cambiar el formaldehído de muestras de una cierta antigüedad por formaldehído nuevo. Este formaldehído ya utilizado se descarta como residuo. Nuestra propuesta consiste en establecer un método que permita regenerar ese formaldehído desechado, para minimizar los costes de investigación (mantenimiento de muestras) y de generación de residuos tóxicos.

Como ejemplo tomamos una muestra-estudio (en nuestro caso se utilizó formaldehído desechado por el laboratorio de Oceanografía del INMAR de la Universidad de Cádiz). Lo primero que se hizo fue caracterizar esta muestra-estudio. Esa caracterización consistió en medirle la concentración de formaldehído, su pH y su turbidez. Su concentración resultó ser de 3,7 %, su pH de 5,5 y su turbidez fue alta concretamente tuvo una absorbancia de 0,168 unidades de absorbancia ( $\lambda = 400$  nm)

(Tabla 5 y Fig. 12), cuando los parámetros aceptables son 4% de concentración de formaldehído, pH entre 7 y 8 y turbidez < 0,05 unidades de absorbancia.

Para restablecer el formaldehído se realizaron 3 acciones:

- A) Reducir la turbidez.
- B) Corregir el pH.
- C) Enriquecimiento del formaldehído hasta el 4%.

#### **A) Reducción de la turbidez.**

La principal causa de esta turbidez suelen ser partículas y grasas procedentes de los organismos, las cuales le dan un color amarillento (Steedman, 1976). Para eliminar esas partículas, la disolución se filtró usando la filtración en superficie y en profundidad. En ambos métodos la turbidez se redujo considerablemente, pero se observó muy poca diferencia entre la filtración en superficie y de la en profundidad (Tabla 5 y Fig. 12). La filtración en profundidad suele ser una mejor alternativa, ya que se trata de una filtración con una mayor capacidad de almacenamiento de sólidos y una evolución más lenta de la resistencia al flujo (Ruiz, 2004).

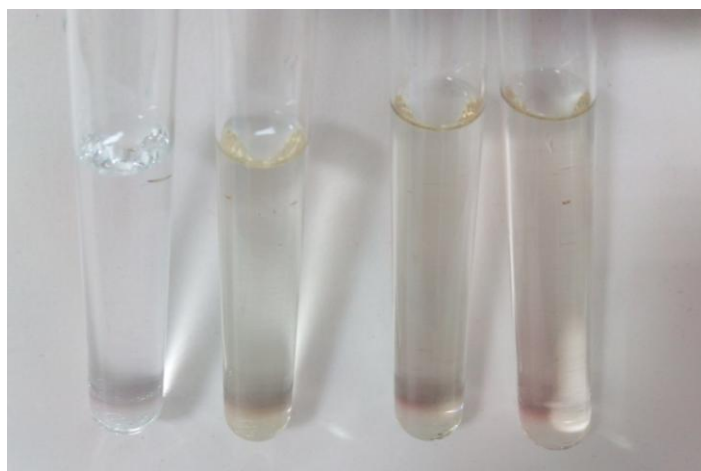


Fig. 12: Apariencia de la solución residual de formaldehído después de diferentes tratamientos. De izquierda a derecha: filtrado pre-cap, filtrado en profundidad, filtrado en superficie, sin filtrar.

Tabla 5: Valores de espectrofotometría (en unidades de absorbancia) para la turbidez de las diferentes maneras de filtrado medidos a 400 nm.

<b>Filtrado</b>	<b>Valor</b>
Sin filtrar	0,168
Filtrado en superficie	0,121
Filtrado en profundidad	0,111
Filtrado pre-capa	0,034

### **B) Corrección del pH**

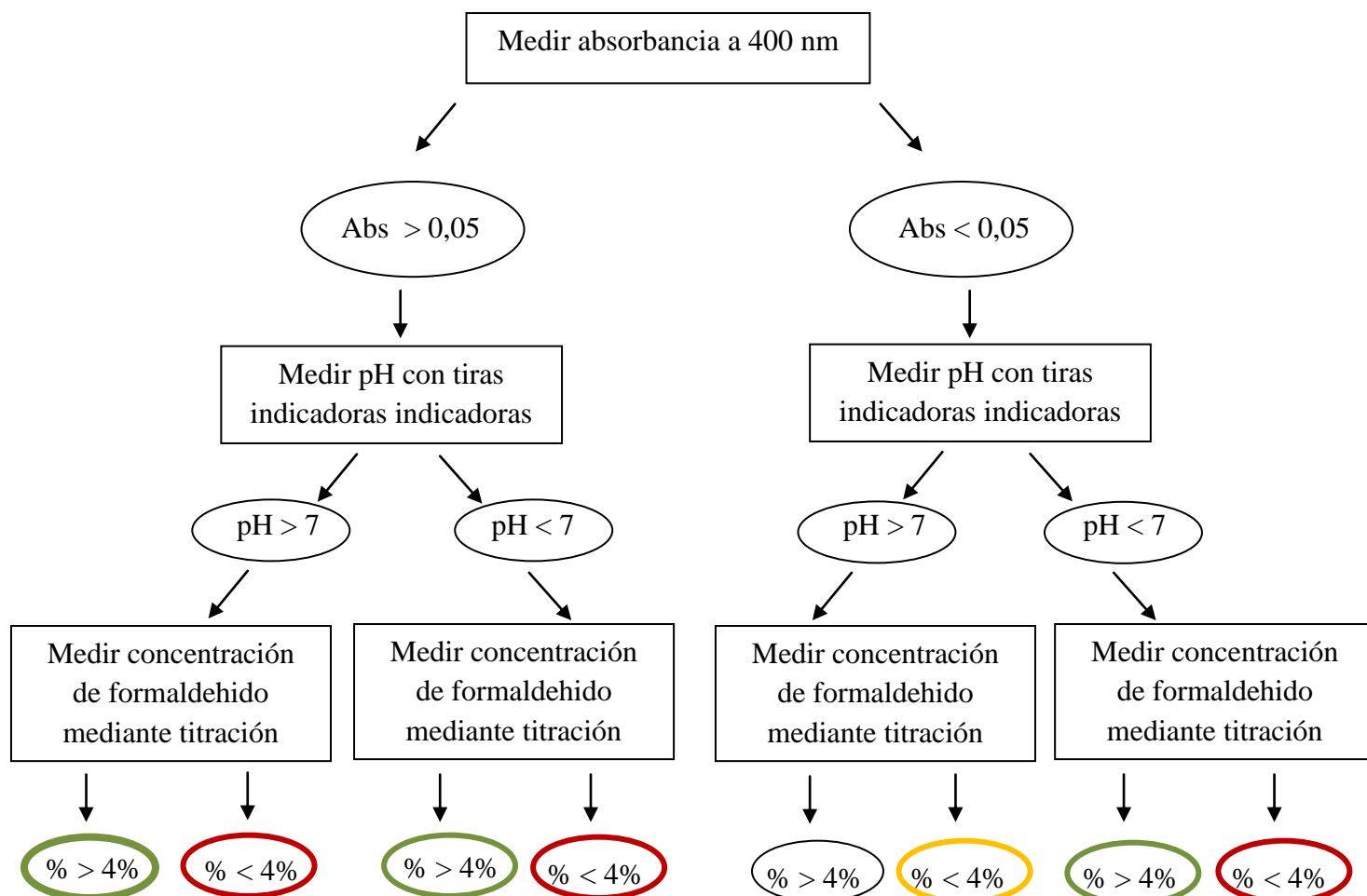
Para restablecer el pH del residuo entre 7 y 8 se empleó tetraborato sódico a sobresaturación, de la misma forma que se suele hacer con el formaldehído nuevo (Steedman, 1976). El tetraborato no solamente volvió a restablecer el pH alcalino, sino que también ayudó a generar una filtración tipo precapa (Leichkis, 1993). Este método de filtración fue muy eficaz. Las partículas de tetraborato (precipitado) forman una capa sobre el elemento filtrante aumentando su eficacia como puede observarse en la turbidez de las muestras generadas (Tabla 5 y Fig. 12).

### **C) Enriquecimiento del formaldehído hasta el 4%.**

Una vez ajustado el pH y filtrada la muestra se añadió el volumen necesario de formaldehído concentrado (Ecuación 6) obteniéndose así una solución de formaldehído al 4% que puede ser reutilizada.

#### D) Árbol de toma de decisiones

Aquí se presentan los tratamientos a seguir dependiendo del estado de la disolución de formaldehído a regenerar. En cuadros están descritas las acciones a seguir, en círculos los resultados.



Nada. El formaldehído está listo para ser reutilizado.



Enriquecer la muestra con formaldehído concentrado al 37-40% (Ecuación 6).



Tamponar la muestra con tetraborato sódico en exceso y filtrar posteriormente.



Tamponar la muestra con tetraborato sódico en exceso, filtrar y enriquecer la muestra con formaldehído concentrado al 37-40% (Ecuación 6).

#### **4. CONCLUSIONES**

- La espectrofotometría no es un método apto para determinar la concentración del formaldehído entre 0,5 y 8%, debido a su poca sensibilidad.
- Tanto el Kit de HANNA como la titración tradicional (Steedman, 1976) son métodos fiables y precisos para la determinación de la concentración del formaldehído entre 0.5 y 8%.
- No se detectó una relación en la degradación del formaldehído con la proporción aire/formaldehído ni biomasa/formaldehído.
- No se detectó una degradación del formaldehído debida a los distintos taxones conservados.
- Se encontró una relación en la degradación del formaldehído con el tiempo.
- El formaldehído se puede volver a reutilizar y con la filtración precapa se consiguió mejorar notablemente la turbidez del formaldehído recuperado.

## 5. BIBLIOGRAFÍA

- Acebo González, D., & Hernández García, A. T. (2013). Los métodos Turbidimétricos y sus aplicaciones en las ciencias de la vida. *Cenic ciencias biológicas*, 44(1), 1-17.
- APHA, AWWA, & WPF. (1999). 2130 Turbidity. En W. E. F. American Public Health Association, American Water Works Association (Ed.), *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (pp. 2-11). Washington: American Public Health Association.
- Bach, P. H., & Baker, J. R. J. (2012). *Histochemical and Immunohistochemical Techniques: Applications to pharmacology and toxicology*. UK: Springer Science & Business Media.
- Baker, J. R., & McCrae, J. M. (1966). The fine structure resulting from fixation by formaldehyde: the effects of concentration, duration, and temperature. *Journal of the Royal Microscopical Society*, 85(4), 391-399. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1966.tb01017.x>
- Bartolomé Camacho, C., & Sánchez Fortún Rodríguez, S. (2007). Valoración de la toxicidad aguda de biocidas utilizados en ambientes de la vida privada y la salud pública sobre *Artemia franciscana*. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales*, 3(1), 90-97.
- Blum, F. (1893). Der Formaldehyd als Härtungsmittel. En W. J. Behrens (Ed.), *Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie und mikroskopische Technik*. (10.<sup>a</sup> ed., p. 576). Braunschweig: Harald Bruhn. Consultado el 25 de enero 2017 en: <http://www.biodiversitylibrary.org/item/26432#page/6/mode/1up>
- Brauers, T., Bossmeyer, J., Dorn, H. P., Schlosser, E., Tillman, R., Wegener, R., & Wahner, A. (2007). Investigation of the formaldehyde differential absorption cross section at high and low spectral resolution in the simulation chamber SAPHIR. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 7(13), 3579-3586.
- Bricker, C. E., & Johnson, H. R. (1945). Spectrophotometric Method for Determining

- Formaldehyde. *Industrial & Engineering Chemistry*, 17(6), 400-402.  
<http://doi.org/10.1021/i560142a021>
- Díaz, N. A., Bárcena Ruiz, J. A., Reyes, E. F., Cejudo, A. G., Novo, J. J., Peinado, J. P., Melendez-Valdes, F. T. & Fiñana, I. T. (2000). 8. Espectrofotetría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas. Consultado el 25 de enero de 2017, en [http://www.uco.es/organiza/departamentos/bioquimica-biol-mol/pdfs/08\\_ESPECTROFOTOMETRÍA.pdf](http://www.uco.es/organiza/departamentos/bioquimica-biol-mol/pdfs/08_ESPECTROFOTOMETRÍA.pdf)
- Formafix. (2017). Formafix Formalinrecycling. Consultado el 21 de enero de 2016, en: <http://www.formafixglobal.com/web/formalinrecycling.html>
- Fox, C. H., Johnson, F. B., Whiting, J., & Roller, P. P. (1985). Formaldehyde Fixation. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 33(8), 845-853.  
<http://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000692>
- Fox, M. A., & Whitesell, J. K. (2004). *Organic Chemistry* (3.<sup>a</sup> ed.). North Carolina: Jones & Bartlett Learning. Consultado el 25 de enero 2017 en: [https://books.google.com/books?id=xx\\_uIP5LgO8C&pgis=1](https://books.google.com/books?id=xx_uIP5LgO8C&pgis=1)
- Guimarães, J. R., Turato Farah, C. R., Maniero, M. G., & Fadini, P. S. (2012). Degradation of formaldehyde by advanced oxidation processes. *Journal of Environmental Management*, 107, 96-101.  
<http://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.04.024>
- Gullickson, R. (1994). Reference Data Sheet on Formaldehyde. Consultado el 30 de enero de 2017, en <http://www.meridianeng.com/formalde.html>
- IARC. (2012). Agents classified by the IARC monographs. Consultado el 15 de febrero de 2017, en: [http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/latest\\_classif.php](http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/latest_classif.php)
- Jaman, N., Hoque, M. S., Chakraborty, S. C., Hoq, M. E., & Seal, H. P. (2015). Determination of formaldehyde content by spectrophotometric method in some fresh water and marine fishes of Bangladesh. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 2(6), 94-98.
- Leichkis, I. M. (1993). Breakdown of particles into flow during filtration on precoat filters. *Chemical Engineering and Processing*, 32(4), 209-216.



[http://doi.org/10.1016/0255-2701\(93\)80002-X](http://doi.org/10.1016/0255-2701(93)80002-X)

Martínez, A. D. (2006). Métodos de análisis físicos y espectrofométricos para el análisis de aguas residuales. *Technología en marcha*, 19(2), 31-40.

Martínez Nieto, J. L., González Días, O. M., Herrera Melián, J. A., & Araña, F. J. (2000). *Estudio comparativo de diferentes técnicas de degradación de un residuo real de formalina de uso veterinario*. Vector plus. Las Palmas: Fundación Universitaria Las Palmas.

Pascual Benés, A., & Freixa Blanxart, A. (2004). *NTP 170: Toma de muestras de formaldehído*. España. Consultado el 23 de enero 2017 en: [http://insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTecnicas/NTP/Ficheros/101a200/ntp\\_170.pdf](http://insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTecnicas/NTP/Ficheros/101a200/ntp_170.pdf)

Rios, Y. (2012). *Espectroscopia UV-Visible* (No. 2). Valencia. Consultado el 8 de noviembre 2016 en: <http://www.yolanda-rios.net/materiales/UVTeoria.pdf>

Rodriguez González, C. R., Bonilla Arboleda, J. P., Gastelbondo Amaya, J., Hugeth, V. R., Montoya Páez, J. F., Orozco Suárez, L. M., & Rojas Gutiérrez, R. A. (2006). Formaldehído. En M. de A. de Colombia, V. y D. T. de Colombia, & C. C. de Seguridad (Eds.), *Guía para manejo seguro y gestión ambiental de 25 sustancias químicas* (p. 431). Colombia: Ministerio de Ambiente de Colombia. Consultado el 25 de enero 2017 en: [http://www.minambiente.gov.co/images/AsuntosambientalesySectorialyUrbana/pdf/sustancias\\_químicas\\_y\\_residuos\\_peligrosos/guia\\_25\\_sustancias.pdf](http://www.minambiente.gov.co/images/AsuntosambientalesySectorialyUrbana/pdf/sustancias_químicas_y_residuos_peligrosos/guia_25_sustancias.pdf)

Ruiz, A. A. (2004). La biofiltración , una alternativa para la potabilización del agua. *Lasallista De Investigacion*, 1(2), 61-66.

Seilnacht. (2016). Formaldehyd, Methanal. Consultado el 26 de octubre de 2015, en: [http://www.seilnacht.com/Chemie/ch\\_forma.htm](http://www.seilnacht.com/Chemie/ch_forma.htm)

Steedman, H. (1976). Zooplankton fixation and preservation. En *Monographs on oceanographic methodology* (p. 350). Paris: The Unesco Press. ISBN: 92-3-101272-X

Technologies, U. (2017). Formaldehyde Oxidation. Cnsultado el 21 de enero de 2016,

en: <http://www.h2o2.com/industrial/applications.aspx?pid=109&>

The Smithsonian Institution. (2017). Specimen Processing Procedures. Consultado el 23 de noviembre de 2015, en <http://invertebrates.si.edu/USAP2/usapspec.html>

Tokuda, Y., Nakamura, T., Satonaka, K., Maeda, S., Doi, K., Baba, S., & Sugiyama, T. (1990). Fundamental study on the mechanism of DNA degradation in tissues fixed in formaldehyde. *Journal of clinical pathology*, 43(9), 748-51.

Vutturi, A. vardhan. (2015). Cannizzaro Reaction. Consultado el 21 de enero de 2016, en: <http://www.adichemistry.com/organic/namedreactions/cannizzaro/cannizzaro-1.html>

Walker, J. F. (1944). *Formaldehyde*. New York: Reinhold Publishing Corporation. Consultado el 21 de enero de 2016 en : <https://es.scribd.com/document/95528016/Book-on-Fformaldehyde>

Yoshikawa, K., Morita, T., Ishikawa, T., & Sakuragawa, A. (2011). Determination of Formaldehyde in Seawater Samples by High-performance Liquid Chromatography with UV Detection using an Acetylacetone Derivatization. *Bulletin of the Society of Sea Water Science, Japan*, 65, 169-176.